

Antagonističko dejstvo saprofitne bakterije *Serratia liquefaciens* prema fitopatogenim gljivama kukuruza i potencijalni biohemijski i molekularni mehanizmi njenog dejstva

- Originalan naučni rad -

Snežana GOŠIĆ-DONDO, Snežana MLADENOVIĆ DRINIĆ i Slavica STOJKOV
Institut za kukuruz "Zemun-Polje", Beograd-Zemun

Izvod: Ispitivan je antagonistički efekat saprofitne bakterije *Serratia liquefaciens*, poreklom iz rizosfere suncokreta na fitopatogene gljive kukuruza u *in vitro* i *in vivo* uslovima, kao i potencijalni mehanizmi dejstva na biohemijskom i molekularnom nivou.

Uočeno je da bakterijska vrsta *S. liquefaciens* ne poseduje sposobnost sinteze antibiotika. Antagonistički efekat koji je ova vrsta ispoljila prema *Ph.ambiguum* pri gajenju na hranljivoj podlozi sa različitim koncentracijama glukoze rezultat je postojanja kompeticijskog odnosa. U interakciji sa fitopatogenim gljivama došlo je do *de novo* sinteze proteinskih frakcija različitih molekulskih težina. Uspešno delovanje ovog bakterijskog izolata na razvoj fitopatogene gljive *Ph. ambiguum* ustanovljeno je i u *in vivo* uslovima, koje se ispoljavalo izostankom simptoma bolesti (truleži korena i stabla) i stimulativnom dejstvu na porast korena kao i nadzemnih delova biljke.

Ključne reči: Antagonizam, biološka borba, fitopatogene gljive kukuruza, *Serratia liquefaciens*.

Uvod

Kukuruz spada u grupu ekonomski najznačajnijih poljoprivrednih kultura jer su mogućnosti njegovog iskorišćavanja velike, pa su i površine pod ovim usevom i kod nas i u svetu ogromne. Zamena lokalnih sorti hibridima, primena većih količina mineralnih đubriva, gušći sklop biljaka, primena herbicida doveli su stvaranja idealnih uslova za pojavu fitopatogenih gljiva, a samim tim i bolesti koje one sa sobom nose, **Penčić**, 1995. Tako je došlo do masovnije pojave lisne pegavosti i nekroze lista prouzrokovane gljivom *Bipolaris zeicola*, sive pegavostil lista - *Exserochilum turcicum*, truleži klipa - *Fusarium oxysporum* i *Nygrospora oryzae*, truleži korena i stabla - *Phaeocystostroma ambiguum* i *Mycrodochium bolleyi*.

J. Sci. Agric. Research/Arh. poljopr. nauke 64, 225-226 (2003/1-2), 45-50

Primena uobičajenih mera zaštite (agrotehničkih i hemijskih), pokazala je svoje nedostatke. Poslednjih godina u svetu je proizvedeno nekoliko biopesticida, pa su proučavanja velikog broja saprofitnih i fitopatogenih mikroorganizama kao mogućih biopesticida sve aktuelnija. Bakterijski sojevi *Bacillus subtilis* (Ehrenberg), *Pseudomonas fluorescens* (Trevisan) Migula i *Trichoderma sp.* registrovani su kao antagonistički organizmi i prisutni na tržištu, *Uoti*, 1995.

Savremena naučna istraživanja u oblasti fitopatologije su usmerena ka boljem razumevanju uzročnika bolesti, mehanizma njihovog dejstva kao i primeni metoda biotehnologije za stvaranje mikroorganizama antagonista biljnim patogenima.

Materijal i metode

Izolacija i identifikacija bakterija i gljiva. *Serratia liquefaciens* je izolovana iz rizosfere suncokreta u Institutu za suncokret u Dobrudži, Bugarska. Sve odlike ovog bakterijskog soja proučene su primenom klasičnih metoda (odgajivačkih, morfoloških i biohemijskih) i API (Bio Merieux, France) i Microlog 1 sistemom. Fitopatogene gljive su izolovane iz zaraženog stabla, korena i listova kukuruza po metodi koju je razradio *Kruger*, 1989. Determinacija izolata fitopatogenih gljiva do nivoa vrste vršena je na osnovu proučavanja morfoloških (oblik konidija, izgled hiluma i vrha konidija, način klijanja i formiranja septi) i patogenih karakteristika izolata.

Ispitivanja antagonističkog dejstva. Da bi se utvrdilo postojanje antagonističkog dejstva bakterijskog izolata, ogledi su postavljeni na PDA i LB podlozi u tri ponavljanja, prema odabranim metodama *Guterson-a i sar.*, 1986, i *Siepmann-a*, 1987. Proučavanje ove dve metode imalo je za cilj da se izabere ona metoda koja pokazuje najveći stepen antagonističkog dejstva. Za obe metode korišćena je bakterijska suspenzija starosti 24^h, koncentracije 6×10^8 cfu/ml koja odgovara Mc Farlandu 2. Pripremljena bakterijska suspenzija je zasejana na krompir dekstrozu, odnosno LB podlogu u krug prečnika 5 cm po *Guterson-u i sar.*, 1986, i 150 µl duž prave vertikalne linije na 3 cm od fragmenta gljive po *Siepmann-u*, 1987, i inkubirana 24^h na temperaturi od 26°C. Fragmenti gljive nanošeni su na podlogu nakon 24^h. Dvojne kulture bakterija i gljiva inkubirane su 7 dana na temperaturi od 26°C.

Mehanizam antagonističkog delovanja. Pokušali smo da utvrdimo da li je mehanizam inhibicije razvoja fitopatogenih gljiva: (i) stvaranje supstanci tipa antibiotika metodom diskova podloge po *Hsu i Lockwood-u*, 1969, (ii) konkurentska sposobnost pri korišćenju ugljenikovih jedinjenja tipa glukoze po *Mohamed-u i Caunter-u*, 1995, (iii) analiza proteinskog kompleksa bakterija u interakciji i bakterija u kontroli po metodi *Laemmli-a*, 1970.

Proučavanje antagonističkog dejstva u *in vivo* uslovima. Za ova ispitivanja korišćene su biljke u fazi 3 lista, koje su nastale iz semena koje je tretirano suspenzijom bakterije i suspenzijom gljive. Kao kontrola poslužile su biljke nastale iz semena tretiranog sterilnom vodom. Merena je dužina i ukupna masa nadzemnih delova i korena biljke kukuruza.

Rezultati i diskusija

Bakterijski soj TK-1 poreklom iz suncokreta identifikovan kao *S. liquefaciens*, posle sedam dana je ispoljio jako inhibitorno dejstvo prema parazitnim gljivama *Ph. ambiguum*, *N. oryzae* i *E. turcicum* na obe podloge, primenom metode po **Guterson-u i sar.**, 1986. Inhibitorno dejstvo srednje jačine (56,6%) ovaj soj je ispoljio inkubacijom u dvojnjoj kulturi sa *B. zeicola* na PDA podlozi i sa *F. oxysporum* 43,8 % na PDA i 52,1 % na LB podlozi.

Merenjem prečnika kolonije gljive, primenom metode po **Siepmann-u**, 1987, utvrđeno je da ovaj bakterijski izolat redukuje porast gljive *B. zeicola* i *M. bolleyi* na LB podlozi od 94,1 % i 81,3 %, a u interakcijskim odnosima sa gljivama *E. turcicum* 86,7% i 88,8%, *Ph. ambiguum* 78,8% i 90,7% na PDA odnosno LB podlozi. Na obe podloge ovaj bakterijski izolat gajen u dvojnjoj kulturi sa *F. oxysporum*, pokazao se kao slab antagonist gde je procenat redukcije bio 25, 6 % na PDA i 29,6 % na LB podlozi.

U zavisnosti od primenjene metode ispitivanja, utvrđeno je da postoje razlike u pogledu stepena ispoljenog antagonističkog efekta, tako je u interakciji ove bakterije i gljive *M. bolleyi* primenom metode po **Siepmann-u**, 1987, utvrđeno da se radi o slabom, a primenom metode po **Guterson-u**, 1986, o jakom antagonističkom delovanju.

Savremena naučna istraživanja sve su više usmerena ka pronalaženju mehanizama antagonističkog delovanja. Korišćenjem metode diskova podloge uočeno je da *S. liquefaciens* ne poseduje sposobnost stvaranja difuznih supstanci nalik antibioticima, pa se može reći da to nije mehanizam njenog dejstva na proučavane gljive.

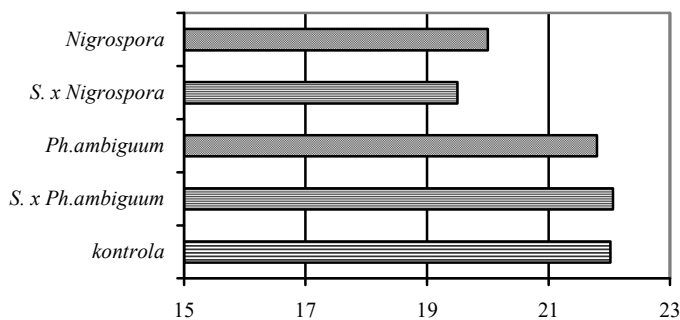
Ispitivanja uticaja primenom različitih koncentracija glukoze u podlozi od 0,1-1%, na inhibiciju razvoja kolonije izolata *B. zeicola*, *Ph. ambiguum* i *N. oryzae* su ukazala na postojanje kompetitivnog odnosa ove bakterije i gljive *Ph. ambiguum*, naročito pri koncentraciji od 1% glukoze u podlozi.

Proteinski kompleks bakterija je ispitivan da bi se utvrdilo da li postoje razlike u sastavu ukupnih proteina između kontrolnih i bakterija u interakciji. Na osnovu elektroforegrama bakterijskog izolata *S. liquefaciens*, utvrđeno je da je proteinski kompleks u interakciji sa svih šest gljiva promenjen. U interakciji sa gljivom *B. zeicola* identifikovana je jedna nova proteinska frakcija visoke molekulske težine (oko 65kDa), kao i odsustvo dve proteinske frakcije srednje molekulske težine (25-45 kDa) u odnosu na kontrolu. U interakciji sa *E. turcicum* takođe se pojavila proteinska frakcija visoke molekulske težine (oko 65 kDa), dok su sve ostale proteinske frakcije identične kontroli. Dve nove proteinske frakcije visoke molekulske težine pojavile su se u interakciji sa *Ph. ambiguum*, dok je u interakciji sa *M. bolleyi* došlo do gubitka dve proteinske frakcije, a u interakciji sa *N. oryzae* do gubitka jedne proteinske frakcije. Identifikacija *de novo* sintetisane proteinske frakcije ili inaktivacija postojeće bi predstavljala početne korake u budućim eksperimentima izučavanja molekularnih mehanizama antagonističkog dejstva.

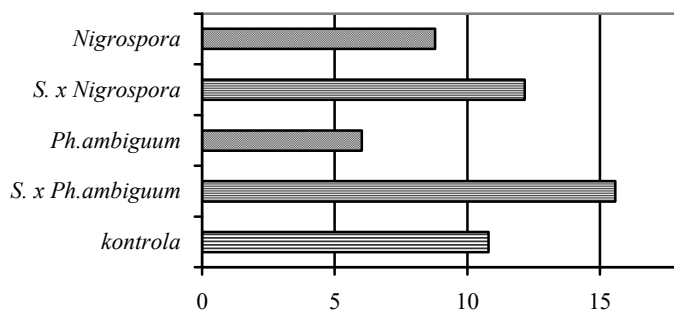
Istraživanja u *in vivo* uslovima vršena su sa namerom da se utvrdi da li ova bakterija utiče na pojavu simptoma bolesti tipa truleži klipa, korena i stabla i lisne

pegavosti i nekroze lista. Iako je ovaj bakterijski izolat pokazao visok stepen antagonističkog dejstva, merenjem dužine nadzemnog dela biljke nisu uočene neke značajnije promene u odnosu na samu gljivu kao i na kontrolu. U interakciji, promene dužine korena su vidljive, naročito u kombinaciji sa *Ph. ambiguum*, što nas navodi na pomisao da se *S. liquefaciens* može smatrati efikasnom u sprečavanju prouzrokovala simptoma truleži korena i stabla (Grafikon 1). Međutim, značajne razlike u ukupnoj masi korena i nadzemnog dela biljke tretirane bakterijom u odnosu na kontrolu nisu utvrđene.

a)



b)



Grafikon 1. Prosečna dužina nadzemnog dela (a) i korena (b) tretiranih biljaka i kontrolnih biljaka kukuruza u interakcijskim odnosima *S. liquefaciens* i *N. oryzae* odnosno *Ph. ambiguum*

The average length of the above ground part (a) and the root (b) of treated and control maize plants in the interaction with *S. liquefaciens* and *N. oryzae* i.e. *Ph. ambiguum*

Zaključak

Primenom različitih metoda, utvrđeno je da postoje razlike u procentu redukcije porasta fitopatogenih gljiva, pa se za buduća istraživanja prioritet daje metodi po **Guterson-u i sar.**, 1986. Najjače antagonističko dejstvo bakterije *S. liquefaciens* uočeno je sa gljivom *Ph. ambiguum*. U istraživanjima je utvrđeno odsustvo difuznih supstanci nalik antibioticima, čime se stvaranje antibiotika isključuje kao mehanizam antagonističkog dejstva. U dvojnoj kulturi *S. liquefaciens* i *Ph. ambiguum* uočen je kompetativan odnos bakterije i gljive pri korišćenju različitih količina ugljenikovih jedinjenja, pa se može reći da je kompeticija za hranu mehanizam dejstva bakterije *S. liquefaciens* na porast gljive *Ph. ambiguum*. Proteinski kompleks bakterija u interakciji sa proučavanim gljivama je promenjen u odnosu na proteinski kompleks kontrolnih bakterija. U dvojnoj kulturi sa *Ph. ambiguum*, *B. zeicola* i *E. turcicum* došlo je do sinteze *de novo* proteinskih frakcija visoke molekulske težine, dok je u interakciji sa *F. oxysporum* došlo je do gubitka proteinske frakcije male molekulske težine. U *in vivo* uslovima, *S. liquefaciens* je u interakcijskim odnosima sa *Ph. ambiguum* izazvala izostanak simptoma bolesti (truleži korena i stabla) i stimulativno uticala na porast korena biljke.

Literatura

- Guttersen, N.I., T.J. Layton, J.S. Zeigle** and **G.J. Warren** (1986): Molecular cloning of genetic determinants for inhibition of fungal growth by fluorescent pseudomonad. *Journal of Bacteriology* **165** (3): 696-703.
- Hsu, S.C.** and **J.L. Lockwood** (1969) : Mechanism of inhibition of fungi in agar by *Streptomyces*. *J. Gen. Microbiol.* **57**: 1075-1078.
- Kruger, W.** (1989): Final Report of the European Cooperative Research Network on Maize, August 21-22, Martonvasar, Hungary.
- Laemmli, U.K.** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature* **227**:680-685.
- Mohamed, S. G.** and **Caunter** (1995): Isolation and characterization of *Pseudomonas fluorescens* strain suppressive o *Bypolaris maydis*. *J. Phytopathology* **143**: 111-114.
- Penčić, V.** (1995): Bibliografija o bolestima kukuruza i mikotoksikozama u Jugoslaviji, izd. Institut za kukuruz, Zemun Polje, Beograd-Zemun.
- Siepmann, R.** (1987): Wachstumsheimmung von Stannfaulepilzen und Von Gremmeniella abietina durch *Bacillus subtilis*. *Eupen Journal of Forest Pathology* **17** (1): 54-61.
- Uoti, J.** (1995): Commercial Biofungicides: Facts or Fantasies. In: Environmental Biotic Factors in Integrated Plant Disease Control, ed. Maalgorzata Manka. Third Conference of European Foundation for Plant Pathology hosted by PTFFit, Poznan, Poland, pp. 113-121.

Primljeno: 13.04.2003.

Odobreno: 20.05.2003.

Antagonistic Effects of the Saprophytic Bacterium *Serratia liquefaciens* on Maize Phytopathogenic Fungi and its Potential Biochemical and Molecular Mechanism

- Original scientific paper -

Snežana GOŠIĆ-DONDO, Snežana MLADENOVIĆ DRINIĆ and
Slavica STOJKOV
Maize Research Institute, Zemun Polje, Belgrade-Zemu

Summary

The objective of our study was to investigate effect of saprophytic bacterium *Serratia liquefaciens* derived from sunflower on maize phytopathogenic fungi *in vitro* and *in vivo* conditions, as well as, potential biochemical and molecular mechanisms.

Obtained results indicate that production of an antibiotic is not a biochemical background of the antagonistic effect. Concurrence advantage of the saprophytic bacterial isolate *S. liquefaciens*, isolated from sunflower, over the parasitic fungus *Ph. ambiguum* when limited quantities of carbon compounds were used in the joint culture, caused antagonistic effect between these two groups of microorganisms. The *de novo* synthesis new polypeptides of different molecular weight occurred in interactions with phytopathogenic fungi. The successful activities of isolates of the saprophytic bacterium under *in vivo* conditions were observed and manifested as lack of disease symptoms (root and stalk rots), and stimulatory effects on the rowth of both, roots and above-ground plant parts. The bacterial isolate *S. liquefaciens* showed the greatest inhibition rate of colonies growth of fungus *Ph. ambiguum* under *in vivo* conditions.

Received: 13/04/2003

Accepted: 20/05/2003

Adresa autora:

Snežana GOŠIĆ- DONDO
Institut za kukuruz "Zemun Polje"
Slobodana Bajića 1
11185 Beograd-Zemun
Srbija i Crna Gora
msnezana@mrizp.co.yu